

AG

AG

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-072432

(43)Date of publication of application : 17.03.1998

(51)Int.Cl.

C07C401/00

C07B 63/00

C07J 9/00

(21)Application number : 09-155140

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 12.06.1997

(72)Inventor : YAMAUCHI TAKESHI

(30)Priority

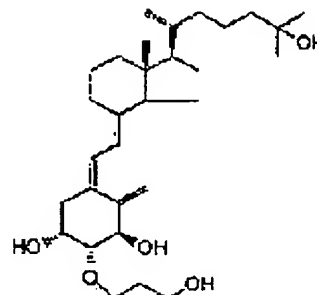
Priority number : 08171321 Priority date : 01.07.1996 Priority country : JP

(54) VITAMIN D DERIVATIVE CRYSTAL AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a vitamin D derivative crystal that is useful for tests and analyses in synthesis of the vitamin D derivative and has high purity, excellent stability and high quality.

SOLUTION: This vitamin D derivative crystal, which has a chemical structure of the formula, and white crystal appearance when observed with the naked eye and further with a fluorescence microscope, forms a transparent 1mg/ml ethanolic solution, and has a melting point of 130° C or higher, and absorptivity of 16000 or more when ϵ at 265nm is measured in a 40 μ g/ml ethanolic solution, is obtained by recrystallizing the vitamin D derivative in such a non-protonic solvent as ethyl acetate, acetone, and acetonitrile.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.06.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3429432

[Date of registration] 16.05.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-72432

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月17日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 401/00		7419-4H	C 0 7 C 401/00	
C 0 7 B 63/00		7419-4H	C 0 7 B 63/00	F
		7419-4H		E
C 0 7 J 9/00			C 0 7 J 9/00	

審査請求 未請求 請求項の数31 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願平9-155140	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 6月12日	(72) 発明者	山内 剛 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平8-171321	(74) 代理人	弁理士 社本 一夫 (外5名)
(32) 優先日	平8(1996) 7月1日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 ビタミンD誘導体結晶およびその製造方法

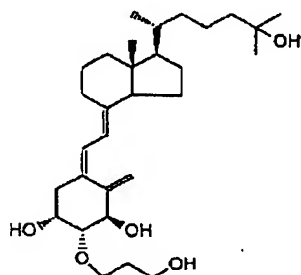
(57) 【要約】

製方法が提供される。

【課題】 ビタミンD誘導体、特にED-71の高純度精製物を大量かつ安定的に供給するための方法確立すること。

【解決手段】 本発明により、式(I)：

【化1】



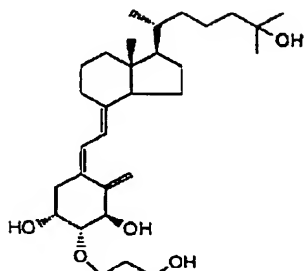
(I)

で表される化合物の結晶；ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させて得られるビタミンD誘導体の結晶；ビタミンD誘導体の合成中に生成する新規な副生物；並びに、ビタミンD誘導体またはその前駆体の精

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(Ⅰ)：

【化1】



(1)

で表される化合物の結晶。

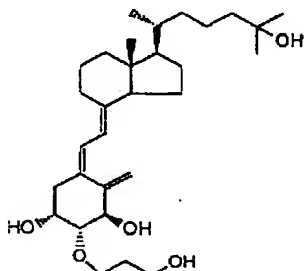
【請求項2】 ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させて得られるビタミンD誘導体の結晶。

【請求項3】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項2記載の結晶。

【請求項4】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項3記載の結晶。

【請求項5】 ビタミンD誘導体が式(Ⅰ)：

【化2】



(1)

で表される化合物であることを特徴とする請求項2記載の結晶。

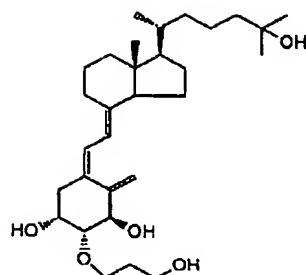
【請求項6】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項5記載の結晶。

【請求項7】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項6記載の結晶。

【請求項8】 逆相系クロマトグラフィーによるビタミンD誘導体の精製方法。

【請求項9】 ビタミンD誘導体が式(Ⅰ)：

【化3】



(1)

で表される化合物であることを特徴とする請求項8記載の精製方法。

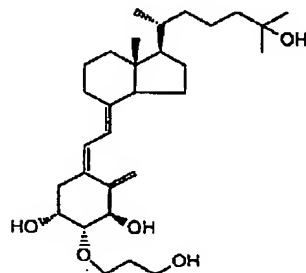
【請求項10】 有機溶媒で結晶化することによるビタミンD誘導体の精製方法。

【請求項11】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項10記載の精製方法。

【請求項12】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項11記載の精製方法。

【請求項13】 ビタミンD誘導体が式(Ⅰ)：

【化4】



(1)

で表される化合物であることを特徴とする請求項10記載の精製方法。

【請求項14】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項13記載の精製方法。

【請求項15】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項14記載の精製方法。

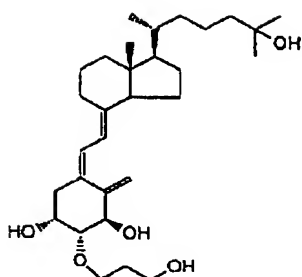
【請求項16】 ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させるビタミンD誘導体の精製方法。

【請求項17】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項16記載の精製方法。

【請求項18】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項17記載の精製方法。

【請求項19】 ビタミンD誘導体が式(Ⅰ)：

【化5】



(I)

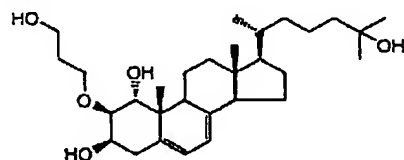
で表される化合物であることを特徴とする請求項16記載の精製方法。

【請求項20】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項19記載の精製方法。

【請求項21】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項20記載の精製方法。

【請求項22】 式(II)：

【化6】



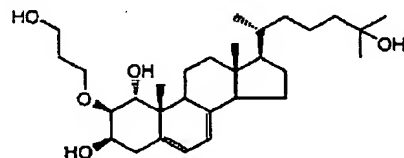
(II)

で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶する式(II)で表される化合物の精製方法。

【請求項23】 アルコールがメタノールであることを特徴とする請求項22記載の精製方法。

【請求項24】 式(II)：

【化7】



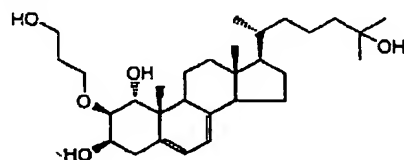
(II)

で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶して得られる精製された式(II)で表される化合物。

【請求項25】 アルコールがメタノールであることを特徴とする請求項24記載の化合物。

【請求項26】 式(II)：

【化8】

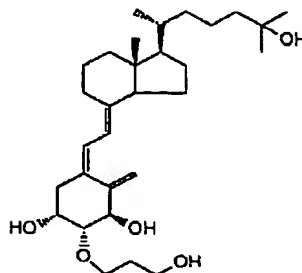


(II)

で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコ

ルで再結晶することによって得た精製された式(II)の化合物を、紫外線照射および熱異性化反応に付して式(I)：

【化9】



(I)

のビタミンD誘導体を得；次いで、上記で得た未精製または粗精製のビタミンD誘導体を、逆相クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させることを含む精製ビタミンD誘導体の製造方法。

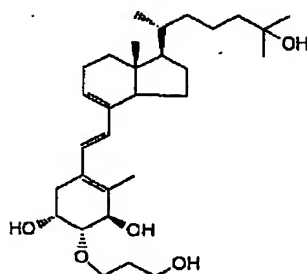
【請求項27】 有機溶媒が非プロトン性有機溶媒であることを特徴とする請求項26記載の製造方法。

【請求項28】 非プロトン性有機溶媒が酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒であることを特徴とする請求項27記載の製造方法。

【請求項29】 アルコールがメタノールであることを特徴とする請求項26から29のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項30】 式(III)：

【化10】

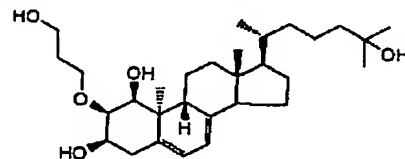


(III)

で表される化合物。

【請求項31】 式(IV)：

【化11】



(IV)

で表される化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

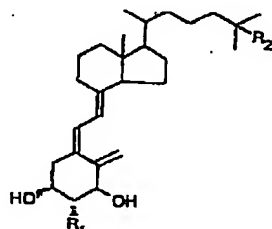
【発明の属する技術分野】本発明は、新規なビタミンD誘導体結晶、より詳細には、逆相クロマトグラフィー

で精製したビタミンD誘導体を有機溶媒で結晶化させて得られる新規なビタミンD誘導体結晶に関する。本発明はまた、結晶化工程を含むビタミンD誘導体の精製方法に関する。

【0002】

【従来技術】各種のビタミンD誘導体は有用な生理活性を有することが知られている。例えば、特公平6-23185号には、下記一般式：

【化12】



【式中、 R_1 はアミノ基又は式 OR' 、(R' は水酸基、ハロゲン原子、シアノ基、アシルアミノ基で置換されているか若しくは非置換の炭素数1～7の低級アルキル基である)を意味し、 R_2 は水素原子又は水酸基を意味する】で示される1 α -ヒドロキシビタミンD₃誘導体が記載されており、この誘導体がカルシウム代謝異常に基づく疾患の治療薬または抗腫瘍剤として有用であることが記載されている。また、上記一般式に属する化合物の1つである1 α , 25-ジヒドロキシ-2 β -(3-ヒドロキシプロポキシ)ビタミンD₃(ED-71とも称される)は骨形成作用を有する活性型ビタミンD誘導体であり、骨粗鬆症治療剤として開発が進められている。

【0003】その一方で、活性化合物の治療用原体の製造においては、より高品質の原体を大量に安定的に製造する必要があり、そのためにできるだけ早い段階で原体の製造方法を確立することが要求されている。特に、ED-71は従来アモルファスの形態でしか得られておらず、結晶の形態で得たという報告はない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ビタミンD誘導体、特にED-71の高純度精製物を大量的かつ安定的に供給するための方法を確立することである。本発明の一つの目的は、未精製物または粗精製物を精製して得たビタミンD誘導体結晶を提供することである。本発明の別の目的は、結晶化工程を含むビタミンD誘導体の精製方法を提供することである。本発明の別の目的は、結晶化工程を含むED-71のプレ体化合物の精製方法、並びに当該方法により得られた精製されたプレ体化合物を提供することである。本発明のさらに別の目的は、ビタミンD誘導体の合成および精製中に副生する新規化合物を提供することである。

【0005】

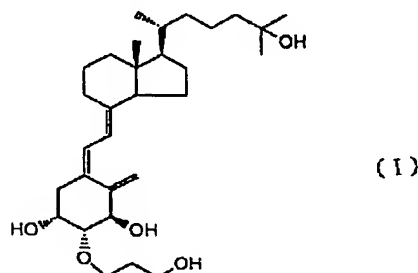
【課題を解決するための手段】本発明者らは、(1) ED-71のHPLC分取精製におけるプロビタミンD誘

導体(プロ体)中の不純物の影響；(2)プレビタミンD誘導体(プレ体)及びED-71の熱、光、酸素による安定性；および(3)微量高生理活性物質であるED-71の取扱い；および(4)結晶化による精製の可能性といった観点に留意して、プロ体からED-71までの合成精製工程を鋭意研究した。その結果、メタノールで再結晶したプロ体を使用し、低温で光反応を行い、熱異性化反応後、逆相系HPLCで精製し、濃縮し、酢酸エチルで結晶化することにより、ED-71結晶をグラムオーダーで得ることに成功し、本発明を完成するに至った。また、本発明者らは、プロ体中および光反応での副生物の構造を解明し、新規な化合物をも同定した。

【0006】すなわち、本発明の一側面によれば、式

(I)：

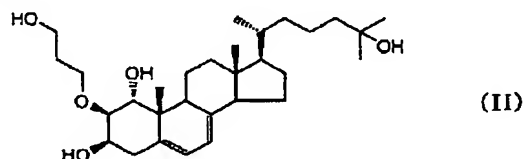
【化13】



で表される化合物の結晶が提供される。本発明の別の側面によれば、ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させて得られるビタミンD誘導体の結晶が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、逆相系クロマトグラフィーによるビタミンD誘導体の精製方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、有機溶媒で結晶化することによるビタミンD誘導体の精製方法が提供される。

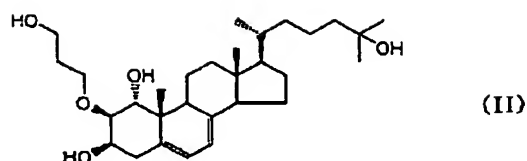
【0007】本発明のさらに別の側面によれば、ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させるビタミンD誘導体の精製方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、式(II)：

【化14】



で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶する式(II)で表される化合物の精製方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、式(I)：

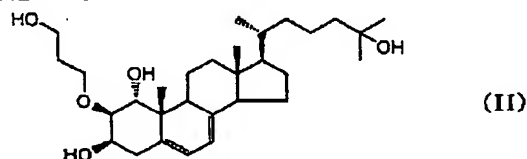
【化15】



で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶して得られる精製された式 (II) で表される化合物が提供される。

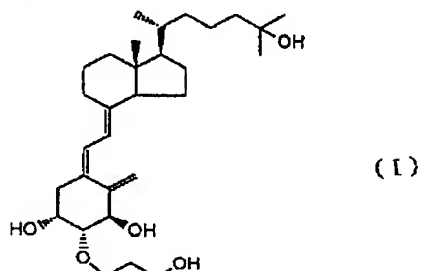
【0008】本発明のさらに別の側面によれば、式 (I) :

【化16】



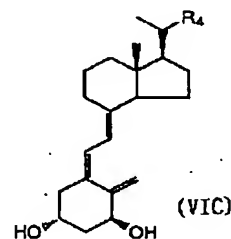
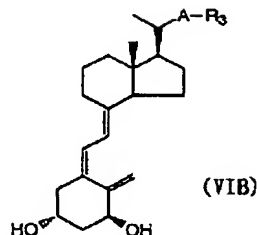
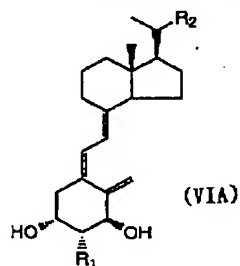
で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶することによって得た精製された式 (II) の化合物を、紫外線照射および熱異性化反応に付して式 (I) :

【化17】



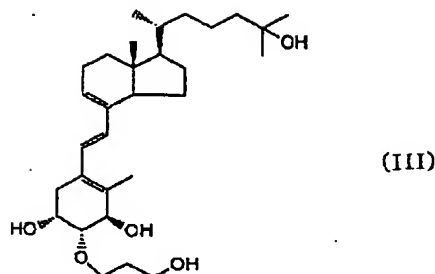
のビタミンD誘導体を得；次いで、上記で得た未精製または粗精製のビタミンD誘導体を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させることを含む精製ビタミンD誘導体の製造方法が提供される。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、式 (II)

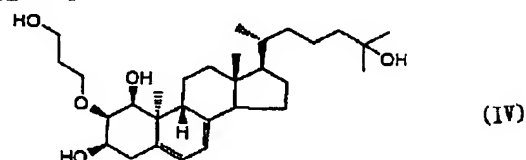


【式中、 R_1 は、(1) アミノ基；(2) $-OR_5$ (R_5 は低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルキニル基であり、これらは各々水酸基、ハロゲン原子、シアノ基、アミノ基、アシルアミノ基、低級アルコキシ基で置

I) :
【化18】



で表される化合物、並びに、式 (IV) :
【化19】

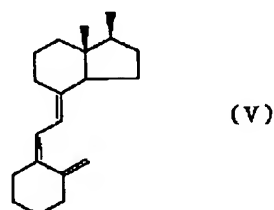


で表される化合物が提供される。これらの化合物は、E D-71のプロ体を紫外線照射および熱異性化反応に付した後の反応液中に存在する化合物である。

【0010】

【発明の実施の形態】本明細書中、ビタミンD誘導体とは、部分構造として、式 (V) :

【化20】



を有するものを意味する。ビタミンD誘導体は好ましくは、式 (VIA)、(VIB) および (VIC) :

【化21】

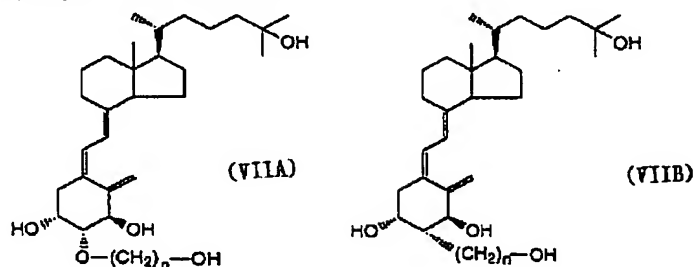
換されていてもよい；あるいは(3) 低級アルキル基、低級アルケニル基または低級アルキニル基であり、これらは各々、水酸基、ハロゲン原子、シアノ基、アミノ基、アシルアミノ基、低級アルコキシ基で置換されて

いてもよい；を示し、 R_2 、 R_3 および R_4 は炭素数1から10のアルキル基、炭素数2から10のアルケニル基または炭素数2から10のアルキニル基を示し、これらは各々1以上の水酸基で置換されていてもよく、Aは硫黄原子または酸素原子を示す]で表される誘導体である。なお、上記定義中の「低級」なる用語は、アルキル基に用いる場合には例えば炭素数1から7のアルキル基を示すために用いられ、アルケニル基およびアルキニル基に用いる場合には例えば炭素数2から7のアルケニル

基を示すために用いられ、アルコキシ基に用いる場合には、例えば炭素数1から7のアルコキシ基を示すために用いられる。

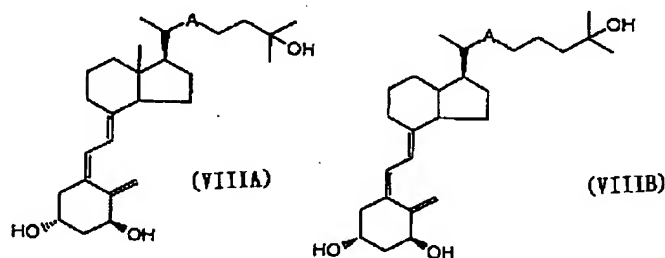
【0011】ビタミンD誘導体はさらに好ましくは、 1α -ヒドロキシビタミン D_3 、 1α 、 25 -ジヒドロキシビタミン D_3 、 24 、 25 -ジヒドロキシビタミン D_3 、または以下の式(VIIA)または(VIIB)：

【化22】



(式中、 n は1から7の整数を示す)または以下の式(VIIIA)または(VIIIB)：

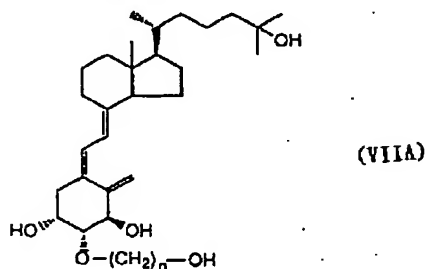
【化23】



(式中、Aは硫黄原子又は酸素原子を示す)で表される誘導体である。

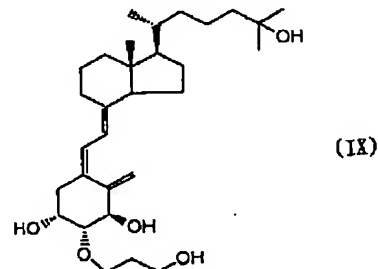
【0012】ビタミンD誘導体は特に好ましくは、式(VIIA)：

【化24】



(式中、 n は1から7の整数を示す)で表される誘導体である。最も好ましいビタミンD誘導体は、式(IX)：

【化25】



で表されるビタミンD誘導体、即ちED-71と称されるものである。

【0013】本明細書中において、「結晶」という用語はその最も広い意味において用いられ、結晶形態、結晶系などは特に限定されないものとする。

【0014】本発明の最も好ましいビタミンD誘導体であるED-71の結晶体は、上記の通り、その性質は特に限定されるものではないが、特に好ましくは以下の条件を充足するものである。

(1) 性状(外観)：肉眼および蛍光顕微鏡により観察し白色の結晶性の粉末。

(2) 溶状：1mg/mLエタノールで透明溶液となる。

(3) 確認: IR法またはNMR法で構造を支持する。
 (4) 融点: DSCで測定して130℃以上を示す。
 (5) 吸光係数: 40 μ g/mLエタノールで265nmの ϵ を測定し、16000以上を示す。

(6) HPLC純度: HPLC (DIACHROMA ODS N-20 5 μ m 4.6 \times 250mm、45%アセトニトリル-水、流速1mL/分、220nm、1mg/mL10 μ L、4-90分)のピーク面積が97%以上である。

【0015】本発明の一側面によれば、ビタミンD誘導体の未精製物または粗精製物を、逆相系クロマトグラフィーで精製した後、有機溶媒で結晶化させて得られるビタミンD誘導体の結晶、並びに、逆相系クロマトグラフィーおよび/または有機溶媒を用いる結晶化によるビタミンD誘導体の精製方法が提供される。

【0016】本明細書中において、「未精製物または粗精製物」とは、ビタミンD誘導体の合成反応直後の未精製のまの生成物、または慣用的な精製方法で粗精製した後のビタミンD誘導体生成物を意味し、それらは通常アモルファス形態で存在している。

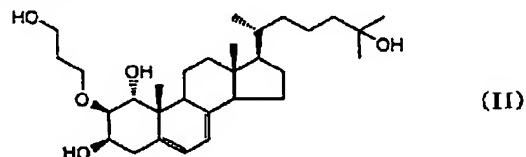
【0017】本明細書中においては、「逆相系クロマトグラフィー」とは、通常の意味と同じように、固定相の方が移動相より極性の小さい系でのクロマトグラフィーを意味する。逆相系クロマトグラフィーは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行うのが好ましい。目的とする物質を効率よく分離するためには分離溶剤、充てん剤の種類およびカラムへの負荷量を適宜選択することが必要である。

【0018】分離溶剤の例としては、アセトニトリル/水系およびメタノール/アセトニトリル/水系などが挙げられるがこれらに限定されるものではない。また、上記の溶剤を用いる場合の混合比率は、精製目的物の種類、充填剤の種類などに応じて最適な比率を選択すればよく、特に限定されない。それらの比率は、一般的には、アセトニトリル20~60重量部、メタノール0~40重量部、そして水0~80重量部である。充てん剤の種類は、粒径、ポアサイズなどを指標にして、使用するカラムあるいは精製目的物との適合性を考慮して適宜選択することができる。カラム負荷量はカラムの内径などに応じて調節することが必要であるが、例えば内径50mmの場合には、25 μ gから10g程度、好ましくは25 μ gから3g程度負荷することができる。

【0019】上記のクロマトグラフィーで得た画分は結晶化に先立って、単離することが必要である。単離法としては、エバポレーターによる濃縮、凍結乾燥、抽出法、逕過法などが挙げられる。上記を含む単離法の中から目的精製物の性質などを考慮して適当なものを適宜選択すればよい。例えばED-71を精製する場合にはエバポレーターによる濃縮が操作上的利点が大きく、再現性があり、またED-71が分解しないという理由により好都合である。

【0020】ビタミンD誘導体の結晶化のために用いる有機溶媒は、好ましくは、非プロトン性有機溶媒である。非プロトン性有機溶媒の例としては、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテルなどのエーテル類、あるいはアセトニトリル、またはこれらの混合溶媒などが挙げられ、特に好ましい有機溶媒は、酢酸エチル、アセトンまたはアセトニトリルあるいはこれらの混合溶媒である。晶析条件は、目的精製物および晶析溶媒に応じて適宜選択する必要がある。一般的には、粗ビタミンD誘導体に対して、1倍から100倍、好ましくは5倍から10倍の溶媒を加えて、30℃以下、好ましくは-10℃以下で晶析させる。

【0021】本発明の一側面によれば、式(II):
 【化26】



で表される化合物の未精製物または粗精製物をアルコールで再結晶する上記化合物の精製方法、並びに当該精製方法により得られた式(II)で表される化合物が提供される。上記の再結晶のために用いられるアルコールは、メタノールである。

【0022】上記のようにアルコールでの再結晶により精製された式(II)で表される化合物の性質は、特に限定されるものではないが、特に好ましくは以下の条件を充足するものである。

(1) 性状(外観): 肉眼および蛍光顕微鏡により観察し白色から黄色の結晶性の粉末。

(2) 溶状: 2mg/mLエタノールで白色から黄色の透明溶液となる。

(3) 確認: IR法およびNMR法で構造を支持する。

(4) 水分: カールフィッシャー法でサンプル量100mg使用し、3.0%以下である。

【0023】(5) 吸光係数: 100 μ g/mLエタノールで282nmの ϵ を測定し、10000以上を示す。

(6) HPLC純度: HPLC (DIACHROMA ODS N-20 5 μ m 4.6 \times 250mm、55%アセトニトリル-水、流速1mL/分、220nm、1mg/mL10 μ L、4-70分)のピークでの面積が85%以上で、プロ体化合物とunP₄間に明瞭なピークがない。

(7) 含量: HPLC (YMC Pack ODS A-303 5 μ m 4.6 \times 250mm、55%アセトニトリル-水、流速1mL/分、220nm、内部標準法)で85%以上である。

以下において本発明を実施例により説明するが、本発明

は実施例によって限定されるものではない。

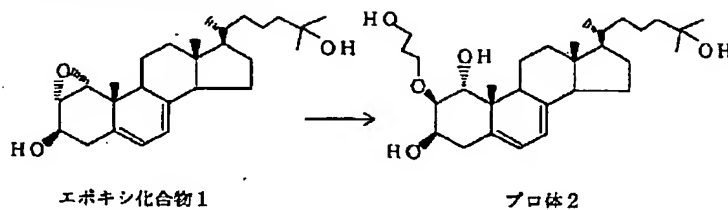
【0024】

【実施例】

実施例1: 2β-(3'-ヒドロキシプロポキシ)-

5, 7-コレスタジエン-1α, 3β-トリオール (プロ体) の合成および精製

【化27】



エポキシ化合物1 (1.00 g, 2.41 mmol)、tert-ブトキシカリウム (0.75 g, 6.68 mmol) および1, 3-プロパンジオール (20 ml) の混合物を室温で10分間攪拌後、内温95℃で5.0時間攪拌した。飽和アンモニア水 (40 ml) に攪拌しつつ反応液を添加した。室温 (25~35℃) で10分間攪拌後、結晶を濾取し、蒸留水 (20 ml) で3回洗浄した。得られた含水粗結晶 (6.3 g) をアセトニトリル (20 ml) 中で室温下 (27~22℃)、1時間攪拌した。結晶を濾取し、アセトニトリル (5 ml) で2回洗浄し、乾燥することによりプロ体化合物2 (0.96 g, 収率 81%) を得た。

【0025】上記方法により得たプロ体化合物2 (29.0 g) を予めアルゴンガスで通気したメタノール290 ml に加熱溶解し、桐山濾紙 (No.4) で温時濾過し、室温まで冷却後、種晶を加え結晶を析出した。-10℃以下に冷却の後、結晶を濾取し、冷却したメタノール29 ml で2回洗浄した。室温で減圧乾燥することにより

精製プロ体22.9 g (回収率79.1%, Net回収率92.1%) を得た。この精製プロ体の物性データは以下の通りであった。

【0026】NMR (CD₃OD) およびIR (KBr): 構造を支持

TLC (CH₂Cl₂:エタノール=9:1): 1スポット (R_f 0.5)

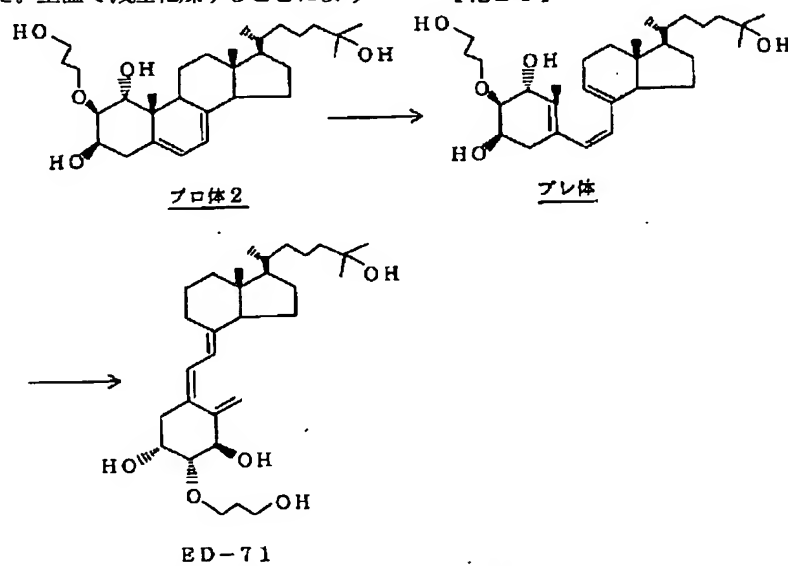
HPLC純度 (220 nm): 98.7%

含量: 97.1% (内部標準法)

DSC: ピークmin; 95.6℃、163.2℃、ピークmax; 120.2℃

【0027】実施例2: (1R, 2R)-1, 25-ジヒドロキシ-2-(3'-ヒドロキシプロポキシ)-コレカルシフェロール; 2β-(3'-ヒドロキシプロポキシ)-(1α, 3β, 5Z, 7E)-9, 10-セココレスター-5, 7, 10(19)-トリエン-1, 3, 25-トリオール (ED-71) の合成および精製

【化28】



【0028】1 L 容器中で、実施例1で得た精製プロ体化合物2 (6.02 g) をTHF (1 L) に溶解し、アルゴン脱気下、冷却状態 (内温-13℃以下) で400 W 高圧水銀灯 (Vycor フィルター使用) により15

0分間紫外線照射した。反応液を室温に戻し、THF (100 mL) で共洗しつつ2 L 茄子型フラスコに移し、180分間加熱還流した。反応液を濃縮後、メタノール (80 mL) に溶解し分離サンプルとした。分離サ

ンプル20mL (プロ体換算1.5g量)を、分取用カラムクロマト装置 (内径50×長さ300mm; 充填剤名DIACHROMA ODS N-20、三菱加工機から入手; 粒径5 μ m) に全量ポンプ注入した。45%アセトニトリル水溶液 (60mL/分) で展開し、UV (220, 305nm) でモニターして ED-71の分画を約2.4L (約130~170分) を得た。同様の操作を3回繰り返し、計4回分のED-71の分取分画約9Lを10LEバポレータで濃縮した。残査をエタノールに溶解し、再度濃縮乾固した。濃縮残査に酢酸エチル (20mL) を加えて溶解し、室温攪拌下、結晶を析出させ、更に-10℃以下に冷却し、15分間攪拌した。結晶を濾取し、冷却した酢酸エチル (6mL) で3回洗浄後、室温で一晩減圧乾燥し、ED-71 (2.17g; 収率36.1%) を得た。

【0029】HPLC純度: 99.8% (220nm), 99.9% (265nm)

UV (エタノール): λ_{max} 265.4nm (ϵ 17100)

DSC: 135.3℃ (ピークmin), 122mJ/mg

残存溶剤 (GC法): 1.24% (酢酸エチル)、0.24% (エタノール)

IR (cm⁻¹): 3533, 3417, 3336, 2943, 2918, 2862, 1649, 1470, 1444, 1416, 1381, 1377, 1342, 1232, 1113, 1078, 1072, 1045, 999, 974, 957, 955, 924, 910, 895, 868, 833, 796, 764, 663, 634, 594, 472

【0030】実施例3: 関連化合物物性データ

光、熱異性化反応時に得られる類縁物質の一部を単離し構造決定および物性データを取得した。実施例1および2で得られたプロ体およびED-71の物性データに関しても詳細に測定した。なお、記載した物性データは再結晶等によって精製したサンプルのものである。融点は未補正である。IRスペクトルはKBr錠剤法でJEOL JIR-6000にて測定した。¹H-NMR、¹³C-NMRスペクトルはTMSを内部標準、又はCHCl₃のピークを基準としJEOL JNM-270EXを用いて測定した。UVは溶媒にエタノールを使用し室温条件でHITACHI U-3210にて測定した。

【0031】プロ体 (実施例1で得たもの) の物性データ

¹H-NMR (ppm): 0.63 (3H, s), 0.96 (3H, d, J²⁰⁻²¹ = 6.3Hz), 1.07 (3H, s), 1.22 (6H, s), 3.6-4.0 (7H, m), 5.36-5.40 (1H, m), 5.70-5.73 (1H, m)

¹³C-NMR (ppm): 141.1, 136.6, 120.8, 115.1, 82.2, 71.0, 70.9, 68.3, 66.7, 59.8, 55.7, 54.4, 44.1, 42.9, 41.3, 39.0, 38.3, 36.3, 36.0, 34.6, 32.0, 28.8, 28.7, 27.9, 22.9, 20.7, 20.5, 18.6, 15.8, 11.7

UV; λ_{max} (ϵ): 294.2nm (6550), 282.2nm (11300), 271.9nm (10500), 204.7nm (2420)

IR (cm⁻¹): 3385, 2941, 2872, 1471, 1468, 1381, 1379, 1327, 1138, 1082, 1080, 1053

【0032】ED-71の物性データ

¹H-NMR (ppm): 6.37 (1H, d; 11.4Hz), 6.05 (1H, d; 11.4Hz), 5.50 (1H, t; 2.1Hz), 5.08 (1H, t; 2.1Hz), 4.32 (1H, d; 8.9Hz), 4.26 (1H, m), 3.88-3.96 (1H, m), 3.85 (2H, t; 5.7Hz), 3.69-3.77 (1H, m), 3.27 (1H, dd; 9.0Hz, 2.8Hz), 2.78-2.83 (1H, m), 2.55 (1H, dd; 10.6Hz, 4.0Hz), 2.42 (1H, bd; 13.6Hz), 1.8-2.1 (5H, m), 1.22 (6H, s), 1.2-1.7 (11H, m), 0.94 (3H, d; 6.3Hz), 0.9-1.1 (1H, m), 0.55 (3H, s)

【0033】¹³C-NMR (ppm): 144.2, 143.0, 132.2, 124.9, 117.2, 111.8, 85.4, 71.6, 71.1, 68.3, 66.6, 61.1, 56.6, 56.4, 45.9, 44.4, 40.5, 36.4, 36.1, 31.9, 29.3, 29.2, 29.1, 27.7, 23.7, 22.4, 20.8, 18.8, 11.9

UV (λ_{max}): 265.4nm (ϵ 17900)

融点: 134.8~135.8℃ (1℃/分)

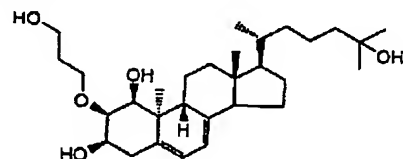
DSC: 137℃ (ピークmin, 115mJ/mg)

TG/DTA: 138℃ (ピークmin, 溶解時乾燥減量約1%, 1.96mg使用)

IR (cm⁻¹): 3533, 3417, 3336, 2943, 2918, 2862, 1649, 1470, 1444, 1416, 1381, 1377, 1342, 1232, 1113, 1078, 1072, 1045, 999, 974, 957, 955, 924, 910, 895, 868, 833, 796, 764, 663, 634, 594, 472

【0034】ルミ体 (以下の式で表されるもの):

【化29】



(IV)

HPLC純度: 97.5% (220nm)

¹H-NMR (ppm): 5.75 (1H, d, J=5.3Hz), 5.42-5.44 (1H, m), 4.19 (1H, q, J=2.9Hz), 3.8-4.0 (4H, m), 3.6-3.7 (1H, m), 3.25 (1H, dd, J=2.6Hz, 9.6Hz), 1.21 (6H, s), 0.90 (3H, d, J=5.6Hz), 0.82 (3H, s), 0.58 (3H, s)

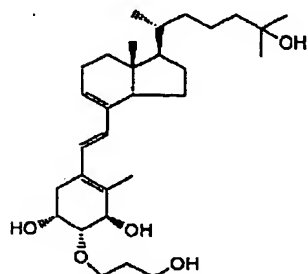
【0035】¹³C-NMR (ppm): 141.9, 136.2, 123.3, 115.5, 82.8, 77.9, 71.1, 67.4, 64.9, 61.1, 57.2

49.5, 46.7, 44.4, 43.8, 41.4, 37.5, 36.2, 35.9, 32.0, 29.4, 29.2, 28.8, 22.6, 21.4, 20.9, 18.5, 18.3, 8.5

UV (λ_{max}): 273.5nm (ϵ 9010)

IR (cm⁻¹): 3437, 3383, 3309, 3041, 2960, 2935, 2872, 2787, 1657, 1641, 1470, 1441, 1375, 1257, 1205, 1203, 1167, 1128, 1097, 1074, 1039, 1011, 98

0, 935.908, 885, 820, 781, 779, 723, 671, 613
 【0036】タキ体(以下の式で表されるもの):
 【化30】



(III)

HPLC純度: 97.6% (220nm)

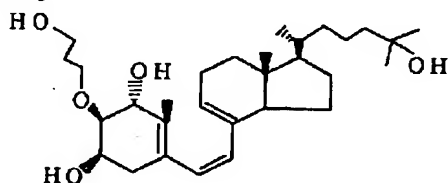
$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 6.65(1H, d, $J=16.1\text{Hz}$), 6.10(1H, d, $J=16.1\text{Hz}$), 5.73(1H, d, $J=2.8\text{Hz}$), 4.21-4.25(2H, m), 3.70-3.90(4H, m), 3.45(1H, dd, $J=2.4\text{Hz}$, 6.0Hz), 1.91(3H, s), 1.22(6H, s), 0.98(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 0.69(3H, s)

【0037】 $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm): 138.1, 130.9, 129.5, 127.8, 126.0, 124.5, 83.1, 72.4, 71.1, 68.5, 65.3, 61.1, 54.0, 50.0, 44.4, 42.8, 36.4, 36.0, 35.9, 31.9, 31.4, 29.4, 29.2, 28.7, 25.1, 24.3, 20.8, 18.7, 15.1, 11.2

UV (λ_{max}): 281.4nm ($\epsilon 26100$)

IR (cm^{-1}): 3375, 2945, 2875, 1664, 1632, 1612, 1468, 1429, 1377, 1215, 1157, 1095, 1068, 957, 908, 879, 764, 710, 646

【0038】アレ体(以下の式で表されるもの):
 【化31】



HPLC純度: 97.2% (220nm)

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 5.91, 5.78(1H \times 2, d, $J=12\text{Hz}$), 5.52(1H, d, $J=3.3\text{Hz}$), 4.0-4.2(2H, m), 3.7-4.0(4H, m), 3.43(1H, dd), 1.76(3H, s), 1.22(6H, s), 0.96(3H, d, $J=6.6\text{Hz}$), 0.70(3H, s)

UV (λ_{max}): 206nm ($\epsilon 10300$)

IR (cm^{-1}): 3377, 2949, 2947, 2872, 1643, 1470, 1435, 1406, 1379, 1377, 1263, 1215, 1140, 1119, 1088, 1063, 1047, 1032, 1030, 962, 937, 935, 756, 735, 542

【0039】実施例4: ED-71のX線結晶構造解析
 ED-71試料(実施例3で使用したED-71試料)より結晶を選出し、X線回折実験を行った。その結果、本結晶は斜方晶系に属し、空間群 $P2_12_12_1$ 、格子定数 $a=10.352(2)$ 、 $b=34.058(2)$ 、

$c=8.231(1)\text{\AA}$ 、 $Z=4$ であることが判明し、2520個の反射データを測定した。構造解析は以下のように行った。直接法(SHELXS86)により位相を求め、非水素原子位置をフーリエ合成により見いだした。炭素に結合した水素原子位置については炭素原子位置より算出した。酸素に結合した水素原子位置は他の原子の位置を求めた後、D合成により見いだした。

【0040】最小二乗法による精密化計算(非水素原子は位置および異方性温度因子を、酸素に結合した水素は位置のみを精密化)の結果、信頼度因子(R値)は3.9%に収斂した。ただし、絶対構造の決定は直接には行わず、13、14、17、20位の配置をコレステロールと同じ配置として計算を行った。以上の解析に基づいて得られた、ED-71の構造と水素結合を図1から図4に示す。

【0041】参考例1: ED-71結晶化合物の安定性
 アモルファスED-71と結晶ED-71について10℃、25℃および40℃の温度で安定性を比較した。安定性の指標としては、HPLC定量アッセイ、吸光度および純度試験(HPLCにおけるピーク面積比)を用いた。試験方法は以下の通りである

【0042】(1)安定性試験の方法

アモルファスと結晶について、約2mgを精密に秤量し、10ml容スクリュウキャップつき試験管(透明)に入れる。真空デシケータ及びグローブボックスを用いて、試験管内をアルゴンガスで置換する(「1M(空気)」と示したポイントの試料はこの操作を行わない)。各温度の恒温槽に試験管を入れ、遮光して保存する。1週間(1W)、2週間(2W)及び1カ月(1M)後に試験管を取り出し、以下の各試験を行う。

【0043】(2)HPLC定量

試験管に無水エタノール5mlを正確に加える(試料溶液とする)。試料溶液1mlと内標準溶液1mlを正確にとり、さらに塩化メチレンを加えて正確に20mlとする(溶液①とする)。尚、内標準溶液は2-アミノピリミジンのメタノール溶液(0.6mg/ml)を用いる。定量用標準溶液(結晶ED-71の無水エタノール溶液; 0.4mg/ml)1mlと内標準溶液1mlを正確にとり、さらに塩化メチレンを加えて正確に20mlとする(溶液②とする)。溶液①及び②の20 μ lについてHPLC測定を行い、各々について内標準のピーク面積に対するED-71のピーク面積の比を求める。溶液①及び②の面積比から、試料溶液中のED-71含量を求める。初期値に対する各ポイントの定量値の比を求め、残存率%とする。

HPLC条件

カラム; YMC A-004SIL (4.6 \times 300mm)

移動相; 塩化メチレン・メタノール混液(95/5)

流速; 1ml/分

検出；UV265nm

【0044】(3) 吸光度

「HPLC定量」で調製した試料溶液1mlを正確にとり、さらに無水エタノールを加えて正確に10mlとし、紫外分光光度計により265nmの吸光度を測定する。吸光度により、E1%を求める。E1%は、Lambert-Beerの法則から誘導されるもので、以下の式により求める。

$$E1\% = A / cb$$

[ここで、Aは吸光度、cはg/100mlでの濃度、bはcmで表した試料中の光路長であり、通常1である]

【0045】(4) 純度試験

(4-1) 順相HPLC

「HPLC定量」で調製した試料溶液1mlをとり、減圧乾燥により溶媒（無水エタノール）を除去する。これに塩化メチレン1mlを加えて再溶解し、25μlについてHPLC測定を行う。

HPLC条件

カラム；YMC A-004SIL (4.6×300mm)

移動相；塩化メチレン・メタノール混液 (96/4)

流速；1.8ml/分

検出；UV265nm

(4-2) 逆相HPLC

「HPLC定量」で調製した試料溶液25μlについて、HPLC測定を行う。

HPLC条件

カラム；Inertsil ODS-2 (5×250mm)

移動相；アセトニトリル・水混液 (55/45)

流速；1ml/分

検出；UV265nm及び220nm

なお、HPLC定量アッセイおよび純度試験については2個の試料の平均値を示す。得られた結果を以下の表1から表5に記載する。

【0046】

表1：HPLC定量アッセイの結果（残存率%）

	10℃		25℃		40℃	
	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶
初期値	100	100	100	100	100	100
1W			99.5	99.4	94.4	99.5
2W	98.5	96.8	94.7	98.8	88.8	102.9
1M	94.8	97.0				
1M（空気）	97.4	95.0				

注：1M（空気）以外はArガス置換

【0047】

表2：E1%

	10℃		25℃		40℃	
	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶
初期値	327.5	350.2	327.5	350.2	327.5	350.2
1W			323.0	349.5	313.2	349.8
2W	324.9	343.8	316.9	341.6	304.0	348.7
1M	320.5	342.7				
1M（空気）	316.3	341.7				

注：1M（空気）以外はArガス置換

【0048】

表3：順相HPLC [P. A. R. (%)] による純度試験 (265nm)

	10℃		25℃		40℃	
	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶
初期値						
ED-71	96.06	99.15	96.06	99.15	96.06	99.15
ブレ体	1.67	0.21	1.67	0.21	1.67	0.21
その他	2.27	0.63	2.27	0.63	2.27	0.63
1W						
ED-71			95.97	99.56	94.47	99.55
ブレ体			1.88	0.14	2.53	0.14
その他			2.14	0.30	3.00	0.31

2W						
ED-71	95.46	99.06	94.74	98.95	92.12	98.92
プレ体	2.27	0.66	2.25	0.67	2.99	0.67
その他	2.28	0.27	3.01	0.38	4.89	0.41
1M						
ED-71	94.58	98.91				
プレ体	2.33	0.65				
その他	3.09	0.44				
1M(空気)						
ED-71	95.26	98.88				
プレ体	2.31	0.66				
その他	2.42	0.46				

注：1M(空気)以外はArガス置換

【0049】

表4：逆相HPLC[P. A. R. (%)]による純度試験(265nm)

	10℃		25℃		40℃	
	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶
初期値						
ED-71	95.38	99.04	95.38	99.04	95.38	99.04
プレ体	1.16	0.36	1.16	0.36	1.16	0.36
その他	3.47	0.60	3.47	0.60	3.47	0.60
1W						
ED-71			94.78	99.35	92.47	99.40
プレ体			1.27	0.28	1.98	0.29
その他			3.95	0.38	5.55	0.31
2W						
ED-71	94.48	98.84	94.20	98.78	90.68	98.75
プレ体	1.75	0.83	1.72	0.85	2.53	0.85
その他	3.77	0.32	4.08	0.37	6.78	0.40
1M						
ED-71	93.05	98.77				
プレ体	1.88	0.86				
その他	5.07	0.37				
1M(空気)						
ED-71	94.11	98.72				
プレ体	1.82	0.86				
その他	4.07	0.42				

注：1M(空気)以外はArガス置換

【0050】

表5：220nm(%)

	10℃		25℃		40℃	
	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶	アモルファス	結晶
初期値						
ED-71	93.95	97.44	93.95	97.44	93.95	97.44
プレ体	1.35	0.52	1.35	0.52	1.35	0.52
その他	4.70	2.04	4.70	2.04	4.70	2.04
1W						
ED-71			93.37	98.17	90.00	98.18
プレ体			1.50	0.44	2.29	0.47
その他			5.13	1.40	7.71	1.35

2W						
ED-71	92.85	97.91	92.39	97.56	87.40	97.65
ブレ体	2.02	1.01	1.93	1.01	2.88	1.02
その他	5.13	1.09	5.68	1.43	9.72	1.33
1M						
ED-71	92.85	97.44				
ブレ体	2.02	1.05				
その他	5.13	1.51				
1M (空気)						
ED-71	92.07	97.09				
ブレ体	2.04	1.09				
その他	5.88	1.82				

注：1M (空気) 以外はArガス置換

【0051】以上の結果から、25℃での2Wまで、並びに40℃での2Wまでにおいては、結晶体の方がアモルファス体より安定性が高いことが明らかに分かる。

【0052】

【発明の効果】本発明のビタミンD誘導体結晶は、純度の向上、安定性の向上および品質の安定化などの利点をもたらし、当該ビタミンD誘導体を含む医薬品などを製造する際に有用である。また、本発明のビタミンD誘導体の精製方法により、高品質のビタミンD誘導体を安定的かつ大量的に（グラムオーダーで）製造することが可能になる。また、本発明のED-71の類縁化合物であるタキ体およびED-71のプロ体の類縁化合物である

ルミ体は新規化合物であり、ビタミンD誘導体の合成における試験または分析の際などに有用である。

【図面の簡単な説明】

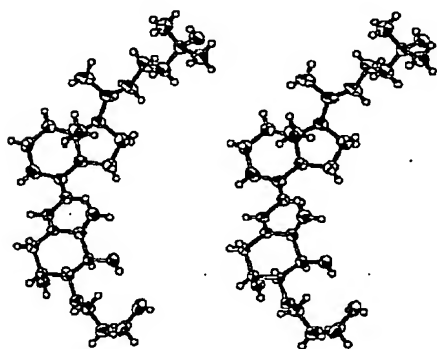
【図1】図1は、ED-71結晶の構造を示す分子構造投影図である。

【図2】図2は、ED-71結晶の構造のステレオ図を示す分子構造投影図である。

【図3】図3は、ED-71結晶の水素結合（関連部分のみを示した）を示す分子構造投影図である。

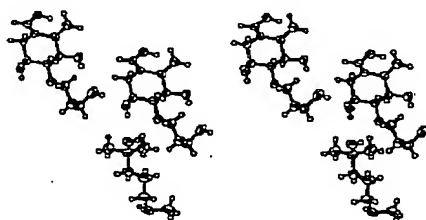
【図4】図4は、ED-71結晶の水素結合（関連部分のみを示した）を示す分子構造投影図である。

【図2】



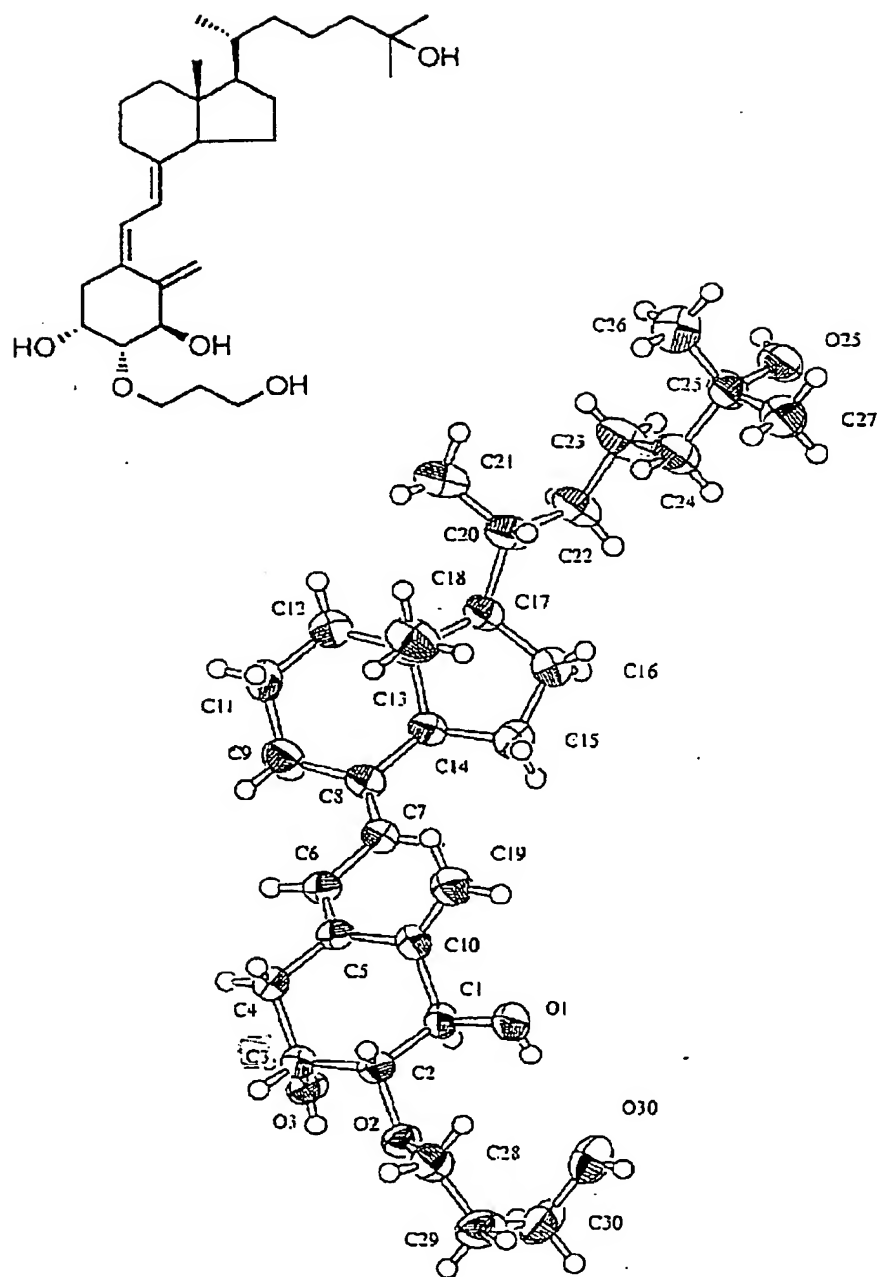
ED-71の構造 (2) ステレオ図

【図4】



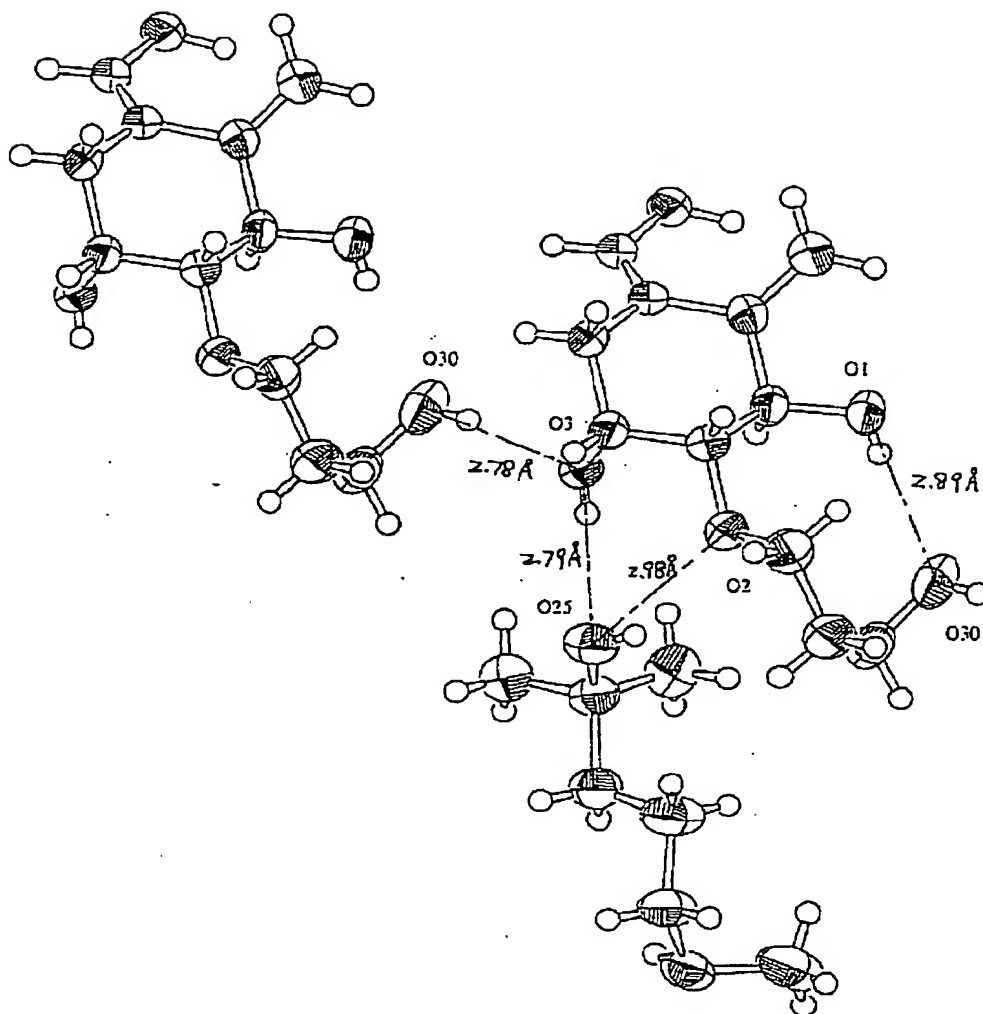
ED-71の水素結合（関連部分のみを示した）(2) ステレオ図

【図1】



ED-71 の構造 (1)

【図3】



ED-71 の水素結合（関連部分のみを示した）(1)